

PN-III-P1-1.1-TE-2021-0418,
Nr. 68/2022

Laccase immobilization onto CS-PAA microspheres and its application for textile dyes biodegradation (IMLAC)

Project leader: Dr. Anca Ruxandra Leontieș

This project was financed by the **Ministry of Research, Innovation and Digitization and Executive Agency for Higher Education, Research, Development and Innovation Funding (UEFISCDI)**, within the **NATIONAL PLAN FOR RESEARCH, DEVELOPMENT AND INNOVATION 2015-2020 (PNIII)** under **Subprogramme 1.1 – Human Resources**, Research projects for stimulation young independent teams.

ABSTRACT

Surface water pollution, with textile dyes, is a serious environmental issue and constant efforts in its reduction are needed continuously. Studies show that the distribution in water bodies and bioavailability of textile dyes affects aquatic fauna and humans. Although enzymes can successfully biodegrade recalcitrant dyes from water, their cost and instability are prohibitive for real-life applications. Therefore, the young team of the IMLAC project aims to develop a practical treatment for the removal of indigo carmine, naphthol green, and methyl red from aqueous media, using immobilized laccase. In this integrated study, the production and use of immobilized enzymes will be investigated and calibrated according to environmental variables, including temperature and pH and, most importantly, cost reduction through recyclability of the product in the presence of dyes will be achieved. The work program of the IMLAC team, based at the "Ilie Murgulescu" Institute of Physical Chemistry, has three complementary components: 1- Production of new polymeric supports for enzymes immobilization. 2 - Development and optimization of a new enzyme immobilization technique. 3 - Application of new products with immobilized laccase in the removal of textile dyes in the aqueous medium. The results of this innovative project could fit into national and European programs facing the double challenge of water quality and water safety.

Main objective

The main objective of the IMLAC project is the establishment of a young, independent research team focused on enzyme immobilization on polymeric supports for applications in recalcitrant dyes decomposition in aqueous media. The IMLAC project involves frontier research activities and has both fundamental and applicative scientific objectives which are: the production of new polymeric supports for enzymes immobilization, the optimization of a new enzyme immobilization technique, the application of new products with immobilized laccase in the removal of textile dyes in the aqueous medium.

Estimated results

The IMLAC team will disseminate the results by global correlation of the experimental data, will write and send for publication three articles, and will participate in three conferences. The team will report to UEFISCDI by submitting the progress and final reports. Media access will be ensured by building a website and a social media page for the presentation of the project.

The team that participated in the research, dissemination and reporting activities:

- Anca Ruxandra Leontieș

Project Leader
- Ludmila Aricov

CS - Scientific researcher
- Raluca Visan

ACS - Researc assistant
- Aurica Precupas

CS III - Scientific researcherIII
- Alexandru Neculae

ACS - Researc assistant
- Catalina Gifu

CS III - Scientific researcher

Project Budget

NR. CRT	DENUMIRE CAPITOL	VALOARE Buget de stat 2022 (lei)	VALOARE Buget de stat 2023 (lei)	VALOARE Buget de stat 2024 (lei)	TOTAL Buget de stat (lei)
1.	Cheltuieli cu personalul (inclusiv taxele de angajator)	65.126,00	101.760,00	36.634,00	203.520,00
2.	Cheltuieli cu logistica din care:	39.821,00	80.670,00	26.449,00	146.940,00
	2.1. Cheltuieli de capital	17.300,00	27.000,00	9.500,00	53.800,00
	2.1.1. Echipamente	0,00	0,00	0,00	0,00
	2.2. Cheltuieli privind stocurile	12.521,00	33.670,00	9.949,00	56.140,00
	2.3. Cheltuieli cu serviciile executate de terti	10.000,00	20.000,00	7.000,00	37.000,00
3.	Cheltuieli de deplasare	10.752,00	16.800,00	6.048,00	33.600,00
4.	Cheltuieli indirecte (regia) (max. 20%)	21.101,00	32.970,00	11.869,00	65.940,00
5	TOTAL	136.800,00	232.200,00	81.000,00	450.000,00

Executive Summary of Stage 1 /May 2022 – December 2022 /(8 months)

Objective O1. aimed to study the behaviour of the free enzyme in the presence of different chemical or physical stressors. Thus, by investigating the effect of buffer, pH, temperature and storage time using standard substrates, the operational profile of the laccase was defined and the optimal working conditions were established (A1.1O1). The carried out activities (A1.2.O1. and A1.3.O1.), led to results demonstrating the efficiency of laccase to degrade textile dyes (methyl red, indigo carmine and naphthol green). The in-depth study of the interaction between dyes and the enzyme (A1.4.O1.) led to the proposal of appropriate models describing the degradation of coloured compounds (A1.5.O1).

Stage 1 activities:

O1.A1.1. Establishing the optimal physico-chemical conditions (choice of buffer, pH and temperature, storage time) using standard substrates and free enzymes.

O1.A1.2. Degradation efficiency evaluation for textile dyes with free laccase in presence/absence of mediators.

O1. A1.3. Elucidation of factors affecting the degradation of dyes using kinetic models.

O1. A1.4. Characterization of interactions between dyes and enzymes at the molecular level.

O1.A1.5. Proposing a mechanism for the dyes decomposition in presence of enzymes and determining the mechanism of enzyme inactivation.

Estimated results

- ✓ Writing and submitting one (1) article for publication.
- ✓ Participation in one (1) scientific conference.
- ✓ Web site and social media page.
- ✓ Writing and submitting a milestone report

Progres Summary

Within **Stage 1** of the IMLAC project, the expected results in the funding request were fully achieved:

-1/1 ISI papers sent for publication :

Ludmila Aricov, Adina Răducan, Catalina Ioana Gifu, Elvira Alexandrescu, Aura Precupas, Alexandru Vincentiu Florian Neculae, Raluca Marieta Visan, Alina Morosan, Anca Ruxandra Leontieș*, The immobilization of laccase on mixed polymeric micro-spheres for methylene red decomposition, Coatings, Manuscript ID coatings-2059652 under review (IF = 3.236)

- 4/1 Conference attendings:

1. Laccase immobilization onto polymeric supports for synthetic dyes degradation, **9th IUPAC International Conference on Green Chemistry**, **Anca Leontieș*, Ludmila Aricov, Raluca Visan, Aurica Precupas, Alexandru Neculae, Catalina Gifu**, Adina Raducan (Poster)

2. The study of a natural antioxidant interaction with a biomaterial substrate, **9th IUPAC International Conference on Green Chemistry**, **Raluca M. Visan, Anca R. Leonties, Ludmila Aricov**, Mihai Anastasescu and Daniel G. Angelescu (Poster)

3. Conformational changes in β -phosphorylated nitroxides – a powerful tool to probe host–guest interactions, **CONFERINȚA NAȚIONALĂ DE CHIMIE, EDIȚIA XXXVI, IN MEMORIAM COSTIN D. NENITESCU 120 DE LA NASTERE**, Alexandru Vincentiu Florian Neculae, Gérard Audran, Sofiane Bourdillon, Gabriela Ionita, Jean Patrick Joly, Sylvain R. A. Marque, Iulia Matei, Sorin Mocanu (Oral presentation)

4. Novel perspectives into chitosan-based materials for its broad applications, **NeXT-Chem IV – 2022**, **Raluca-Marieta VISAN, Anca-Ruxandra LEONTIES*, Ludmila ARICOV**, Daniel-George ANGELESCU (Oral presentation)

- **1/1 Scientific report**

All results were disseminated online on the project website and social media page :

<https://www.researchgate.net/profile/Leonties-Anca-Ruxandra/projects>

https://www.icf.ro/pr_2022/IMLAC.pdf

Executive Summary Stage 2 /16 december 2022 - 16 december 2023/ (12 months)

Objective **O2.** aimed the investigation of the microspheres physico-chemical properties formed by mixing chitosan with polyacrylic acid (Cs and PAA) as well as standardizing the laccase immobilization method. Following extensive documentation on the possibilities of synthesizing polymeric immobilization supports, the technique of polymer precipitation in a hydroxide bath was chosen and polymeric microspheres (**A2.1.O2.**) were synthesized. The following activity (**A2.2.O2.**) led to results regarding the chemical composition of the surface of the microspheres. Following the implementation of activities **A2.3.O2.** and **A2.4.O2.** immobilized enzyme on different solid supports and two optimized immobilization protocols were generated. Within **A2.5.O2.** the characterization of CsPAAALc morphology from a rheological point of view was carried out. For **A2.6.O2.** the degradation efficiency evaluation of ABTS by the immobilized enzyme was carried out and the comparison with the free enzyme was made. Also, the operational stability of the enzyme immobilized on 13 types of solid supports was also investigated.

Stage activities:

O2. A2.1. Documentation and synthesis of polymer microspheres.

O2. A2.2. Microsphere characterization.

O2. A2.3. Enzyme immobilization.

O2. A2.4. Laccase activity assay and immobilization protocol optimization.

O2. A2.5. Characterization of CSPAAALC morphology in terms of homogeneity, porosity and deformation resistance.

O2. A2.6. Evaluation of the degradation efficiency of classical substrates by the immobilized enzyme, comparison with free enzyme and investigation of operational stability.

Progress summary

Within stage number 2 of the IMLAC project, the result indicators expected in the funding request were fully realized :

-2 / 2 ISI works sent for publication/publication:

- 1. Published article:** Trametes versicolor laccase activity modulated by the interaction with gold nanoparticles, **Ludmila Aricov, Aurica Precupas**, Madalina Tudose, Dragos Baltag, Bogdan Trică, Romica Sandu, **Anca Ruxandra Leonties***, Environmental Research, 237, 116920, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116920>. (IF 8,431)
- 2. Published chapter:** Electron Transfer: Mechanisms in Oxidoreductase Enzymes, **Anca R Leonties, Ludmila Aricov**, Adina Raducan, Ed. IGI Global, Fundamental and Biomedical Aspects of Redox Processes, ISBN13: 9781668471982, 344-368DOI: 10.4018/978-1-6684-7198-2.ch016.3.

- 6 / 2 Presentations at international conferences:

1. Trametes Versicolor laccase activity modulated by gold nanoparticles, Anca Ruxandra Leonties, **Aurica Precupas**, Madalina Tudose, Dragos Baltag, Romica Sandu and **Ludmila Aricov**, **International Conference on Environmental Engineering and Management (ICEEM 12)**, Iasi, Romania (poster).

2. The poloxamers' aggregation behaviour in water and the influence of an anionic nonsulfated glycosaminoglycan on the micelle formation, Alexandru Vincentiu Florian Neculae, **Aurica Precupaș**, Vlad Tudor Popa, Iulia Matei, Sorin Mocanu, **Ludmila Aricov** și Gabriela Ioniță, **International Conference of Physical Chemistry ROMPHYSCHEM 17th**, Bucuresti, Romania, (oral presentation).

3. Insights into the Interaction of Gold Nanoparticles with Trametes versicolor Laccase, Aurica Precupaș, **Ludmila Aricov**, Romică Sandu, Mădălina Tudose și **Anca Ruxandra Leontieș**, **International Conference of Physical Chemistry ROMPHYSCHEM 17**, Bucuresti, Romania, (poster).

4. Versatile Multilayered Hydrophobic and Antibacterial Coatings, I. C. Gîfu, R. Ianchiș, C. L. Nistor, M. Anastasescu, **A. R. Leontieș**, **L. Aricov**, M. E. Maxim și C. Petcu, **International Conference of Physical Chemistry ROMPHYSCHEM 17**, Bucuresti, Romania, (poster).

5. Laccase immobilized onto CS-PAA microspheres applied for synthetic dyes decomposition, **Anca Ruxandra Leonties, Ludmila Aricov, Raluca Marieta Vișan, Aurica Precupaș, Alexandru Vincențiu Florian Neculae, Ioana Catălina Gîfu, Adina Răducan, International Conference of Physical Chemistry ROMPHYSCHEM 17**, Bucharest , Romania, (poster).

6. Modulating the Trametes versicolor Laccase activity with gold nanoparticles, **Anca Ruxandra Leonties, Ludmila Aricov, Aurica Precupas, Madalina Tudose, Dragos Baltag, Romica Sandu, 25 Materials, Methods & Technologies**, Burgas, Bulgaria (poster).

- 1/1 **Scientific report**

All results were disseminated via web site: https://www.icf.ro/pr_2022/IMLAC.pdf

Executive summary Stage 3/ 16 december 2023– 30 April 2024 /(4 months)

Objective **O3** showcase the catalytic features of microspheres created by combining chitosan with polyacrylic acid (Cs and PAA) and laccase (Lc), CSPAAALc. **A3.1** tests were done to differentiate between the phenomena of absorption and enzymatic degradation, as well as to evaluate their synergistic effects. The activity **A3.2** involved evaluating the parameters that influence the degradation kinetics of textile dyes in presence of enzymes. The activity **A3.3**, tests were conducted to determine the reaction products, assess and confirm the suggested reaction mechanism.

Activities:

O3. A3.1. Discerning between absorption, enzymatic degradation or synergistic effects.

O3. A3.2. Evaluation of the factors affecting the degradation of textile dyes in the presence of the immobilized enzyme using kinetic models.

O3. A3.3. Identification of reaction producers, evaluation and validation of the proposed reaction mechanism.

Expected result indicators:

- ✓ Drafting and submitting an article for publication.
- ✓ Dissemination of the results obtained on the project website and on the social media page.
- ✓ Writing and submitting the final report.

Summary of progress

Within the framework of stage number 3 of the IMLAC project, the result indicators expected in the funding request were fully achieved, namely:

- **1 / 1 ISI** Article sent for publication, Effective degradation of azo dyes by ABTS-mediated laccase. A kinetic study, Emanuel Vacalie, Daniel Preda, Petruta Oancea, Anca Ruxandra Leonties, Ludmila Aricov, Adina Raducan, Under Review at Process Biochemistry, 22 feb 2024, (IF = 4.4), Q2.

- **1/1 scientific report**

All results were disseminated on the website: https://www.icf.ro/pr_2022/IMLAC.pdf

Executive summary of the objectives achieved during the project implementation period
"Immobilization of laccase on CS-PAA microspheres and its application for the biodegradation of textile dyes,,
Project duration: 02.05.2022 - 01.05.2024

A significant ecological problem is that of surface water pollution with textile dyes. Numerous studies show that both environmental distribution and bioavailability of textile dyes affect humans and aquatic fauna alike. Although enzymes can successfully biodegrade recalcitrant contaminants found in water, their instability and high production cost are an impediment to their large-scale industrial use. The main objective of the IMLAC project was to form a young and independent research team capable of innovating in the field of enzyme immobilization on polymer supports with applications in the degradation of recalcitrant dyes in aqueous media. Consequently, the aim of the young team of the IMLAC project was to develop a protocol using an immobilized enzyme from the class of polyphenol oxidases to remove indigo carmine, naphthol green and methyl red from aqueous media. The IMLAC project had both frontier research activities, fundamental and applied scientific objectives. The scientific objective of the IMLAC team from the "*Ilie Murgulescu*" Institute of Physical Chemistry had a work program consisting of three complementary axes

1. Investigating operational parameters that can affect the laccase
 2. Development of new polymeric supports for laccase immobilization and optimization of an innovative enzyme immobilization method.
 3. The use of new products with immobilized laccase for the removal of textile dyes from the aqueous environment.
- ✓ Thirteen types of mixed polymer supports were developed within the project. Two laccase immobilization protocols were developed for these supports. The activity of immobilized laccase was compared with that of free laccase in degradation studies of classical substrates or selected textile dyes. Integrated research on operational stability examined and calibrated the production and use of immobilized enzymes as a function of temperature, pH and modulators (nanoparticles or salts). Catalyst recycling studies indicate that cost reductions are possible. A problem encountered when using laccase for water treatment could be the formation of toxic or non-biodegradable products. The identified degradation mechanisms show that the investigated substrates are transformed into secondary products that would be susceptible to bacterial and photocatalytic degradation.

The proposed result indicators were: dissemination of results through the global correlation of experimental data, sending three (3) articles for publication and participation in three (3) scientific conferences, while the media coverage will be ensured by the construction of a web-site.

- ✓ The achieved result indicators are: two published articles (Q1 and Q2), one article submitted for publication (Q2), one book chapter in a SCOPUS indexed publication, 10 participations in national/international conferences and the construction of the web-site. Also, the team is working on a new manuscript that will be submitted for publication later this year.
- ✓ Two PhD students participated in this project (Alexandru Vicentiu Florian Necula and Raluca Marieta Toma). Both were part of the publication team of the articles and participated in national and international conferences within this project. These aspects contributed to their formation as researchers in the field of enzyme immobilization, thus improving their knowledge and expanding their field of activity.
- ✓ The results already published in top journals and presented at national and international conferences have led and will lead to increasing the scientific visibility of researchers from the IMLAC project. For example, due to the topic studied, the project director's H index was increased (from 7 in 2022 to 12 in 2024). On the other hand, the fulfilment of all the proposed objectives in the 24 months proves the competence of the group in the field of enzyme immobilization and leads to new collaborations between the team members and other research groups in Romania and elsewhere.
- ✓ As can be seen in the publications, the IMLAC project team collaborated with other departments in the institute and developed links with researchers and PhD students, interested in enzyme catalysis, from other prestigious institutions in Romania (ICECHIM, University of Bucharest - Faculty of Chemistry, Universitatea Politehnică - "Costin Nenițescu" department).
- ✓ Within the project, scientific solutions were identified that may support social development and may improve the human condition by reducing the toxicity of water contaminated with hazardous or persistent substances. The "green" immobilization methods, specific to the IMPLAC group, the immobilization support consisting of biodegradable materials together with the biocatalyst (laccase), gives the final products excellent attributes to be applied, in the future, in the treatment of polluted waters. Thus, the knowledge obtained within this project will be used to further expand the application of the immobilized laccase towards the transfer of knowledge into economic practice by submitting new projects in partnership with economic operators.



MINISTERUL CERCETĂRII,
INOVĂRII ȘI DIGITALIZĂRII



Unitatea Executivă pentru
Finanțarea Învățământului Superior,
a Cercetării, Dezvoltării și Inovării

PN-III-P1-1.1-TE-2021-0418,
Nr. 68/2022

Imobilizarea lacazei pe microsfele din CS-PAA și aplicarea acesteia pentru biodegradarea coloranților textili (IMLAC)

Director de proiect: Dr. Anca Ruxandra Leontieș

Acest proiect a fost finanțat de **Ministerul Cercetării, Inovării și Digitalizării și Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării și Inovării (UEFISCDI)**, în cadrul **PLANULUI NAȚIONAL DE CERCETARE, DEZVOLTARE ȘI INOVARE 2015-2020 (PNIII)**, Subprogramul 1.1 – Resurse umane, Proiecte de cercetare pentru stimularea echipelor tinere independente.

Rezumatul proiectului

Poluarea apelor de suprafață, cu coloranți textili, este o problemă gravă de mediu și sunt necesare eforturi constante pentru reducerea acesteia. Studiile arată că distribuția în mediu și biodisponibilitatea coloranților textili afectează fauna acvatică și oamenii. Deși enzimele pot biodegrada cu succes contaminanți recalcitranti din apă, costul și instabilitatea lor sunt prohibitive pentru aplicații reale. Prin urmare, tânăra echipă a proiectului IMLAC își propune să dezvolte un tratament practic pentru îndepărtarea indigo carminului, verde naftolului și a roșului de metil din medii apoase, utilizând lacază imobilizată. În acest studiu integrat, producerea și utilizarea enzimelor imobilizate vor fi investigate și calibrate în funcție de variabilele de mediu, inclusiv temperatura și pH-ul, iar cel mai important, reducerea costului va fi demonstrată prin reciclarea produsului în prezența coloranților. Programul de lucru al echipei IMLAC, cu sediul la Institutul de Chimie Fizică „Ilie Murgulescu”, are trei axe complementare: 1 - Producerea de noi suporturi polimerice pentru imobilizarea enzimelor. 2 - Dezvoltarea și optimizarea unei noi tehnici de imobilizare enzimatică. 3 - Aplicarea noilor produse cu lacază imobilizată în îndepărtarea coloranților textili în mediul apos. Rezultatele acestui proiect inovator s-ar putea integra în programele naționale și Europene ce se confruntă cu dubla provocare de menținere a calității și siguranței apei.

- **Obiectivul principal al proiectului**

IMLAC este formarea unei echipe de cercetare tinere și independente în domeniul imobilizării enzimelor pe suporturi polimerice cu aplicații în descompunerea coloranților recalcitranți din medii apoase. Proiectul IMLAC presupune activități de cercetare de frontieră și are atât obiective științifice fundamentale, cât și aplicative iar acestea sunt: producerea de noi suporturi polimerice pentru imobilizarea enzimelor, optimizarea unei noi tehnici de imobilizare a enzimelor, aplicarea noilor produse cu lacază imobilizată pentru îndepărtarea coloranților textili din mediu apos.

- **Rezultatele estimate**

Echipa IMLAC va disemina rezultatele prin corelarea globală a datelor experimentale, va scrie și va trimite spre publicare trei articole și va participa la trei conferințe. Echipa va raporta către UEFISCDI prin transmiterea rapoartelor de etapa și final. Accesul media va fi asigurat de construirea unui web-site și a unei pagini de social media pentru prezentarea proiectului.

Echipa ce a participat la activitățile de cercetare, diseminare și raportare a fost formată din:

Anca Ruxandra Leontieș	Director proiect
Ludmila Aricov	CS - Cercetător științific
Raluca Visan	ACS - Asistent de cercetare științifică
Aurica Precupas	CS III - Cercetător științific gradul III
Alexandru Neculae	ACS - Asistent de cercetare științifică
Catalina Gifu	CS III - Cercetător științific

Bugetul proiectului

NR. CRT	DENUMIRE CAPITOL	VALOARE Buget de stat 2022 (lei)	VALOARE Buget de stat 2023 (lei)	VALOARE Buget de stat 2024 (lei)	TOTAL Buget de stat (lei)
1.	Cheltuieli cu personalul (inclusiv taxele de angajator)	65.126,00	101.760,00	36.634,00	203.520,00
2.	Cheltuieli cu logistica din care:	39.821,00	80.670,00	26.449,00	146.940,00
	2.1. Cheltuieli de capital	17.300,00	27.000,00	9.500,00	53.800,00
	2.1.1. Echipamente	0,00	0,00	0,00	0,00
	2.2. Cheltuieli privind stocurile	12.521,00	33.670,00	9.949,00	56.140,00
	2.3. Cheltuieli cu serviciile executate de terti	10.000,00	20.000,00	7.000,00	37.000,00
3.	Cheltuieli de deplasare	10.752,00	16.800,00	6.048,00	33.600,00
4.	Cheltuieli indirecte (regia) (max. 20%)	21.101,00	32.970,00	11.869,00	65.940,00
5	TOTAL	136.800,00	232.200,00	81.000,00	450.000,00

Rezumatul executiv al Etapei 1/ Mai 2022 – decembrie 2022/ (8 luni)

În Obiectivul O1. am studiat comportarea enzimei libere în prezența diferiților stresori chimici sau fizici. Astfel, prin investigarea efectului tamponului, pH-ul, temperaturii și al timpului de stocare folosind substraturi standard, a fost definit profilul operațional al lacazei și s-au stabilit condițiile optime de lucru (**A1.1.O1**). Activitățile, realizate ulterior (**A1.2.O1.** și **A1.3.O1.**), au condus la rezultate prin care s-a demonstrat eficiența lacazei de a degrada coloranți textili (roșu de metil, indigo carmin și verde naftol). Studiul aprofundat al interacției dintre coloranți și enzimă (**A1.4.O1.**) a condus la propunerea unor modele adecvate ce descriu degradarea compușilor coloranți (**A1.5.O1**).

Activitățile Etapei 1:

O1.A1.1. Stabilirea condițiilor fizico-chimice optime privind alegerea tamponului, pH-ul și temperaturii, timpului de stocare folosind substraturi standard și enzime libere.

O1. A1.2. Evaluarea eficienței degradării coloranților textili în prezența lacazei libere cu sau fără mediatori.

O1. A1.3. Elucidarea factorilor ce afectează degradarea coloranților folosind modele cinetice.

O1. A1.4. Caracterizarea interacțiilor între coloranți și enzime la nivel molecular.

O1. A1.5. Propunerea unui mecanism pentru descompunerea lacazei în prezența coloranților și determinarea mecanismului de inactivare al enzimei.

Rezultatele preconizate pentru Etapa 1:

- ✓ Redactarea și trimiterea spre publicare a unui articol.
- ✓ Participarea la o conferință științifică.
- ✓ Construirea unui web site și a unei pagini social media.
- ✓ Redactarea și trimiterea unui raport de etapă.

Sumar al progresului

În cadrul **Etapei 1** a proiectului IMLAC s-au realizat integral rezultatele preconizate în cererea de finanțare, și anume:

-1/1 Lucrări ISI trimise spre publicare:

The immobilization of laccase on mixed polymeric micro-spheres for methylene red decomposition, **Ludmila Aricov, Adina Răducan, Catalina Ioana Gifu, Elvira Alexandrescu, Aura Precupas, Alexandru Vincentiu Florian Neculae, Raluca Marieta Visan, Alina Morosan, Anca Ruxandra Leontieș***, Coatings, Manuscript ID coatings-2059652 în recenzie (IF = 3.236)

- 4/1 Prezentări conferințe:

1. Laccase immobilization onto polymeric supports for synthetic dyes degradation, **9th IUPAC International Conference on Green Chemistry, Anca Leontieș*, Ludmila Aricov, Raluca Visan, Aurica Precupas, Alexandru Neculae, Catalina Gifu, Adina Raducan**

2. The study of a natural antioxidant interaction with a biomaterial substrate, **9th IUPAC International Conference on Green Chemistry, Raluca M. Visan, Anca R. Leontieș, Ludmila Aricov, Mihai Anastasescu and Daniel G. Angelescu**

3. Conformational changes in β -phosphorylated nitroxides – a powerful tool to probe host–guest interactions, **CONFERINȚA NAȚIONALĂ DE CHIMIE, EDIȚIA XXXVI, IN MEMORIAM COSTIN D. NENITESCU 120 DE LA NASTERE**, Alexandru Vincentiu Florian Neculae, Gérard Audran, Sofiane Bourdillon, Gabriela Ionita, Jean Patrick Joly, Sylvain R. A. Marque, Iulia Matei, Sorin Mocanu

4. Novel perspectives into chitosan-based materials for its broad applications, **NeXT-Chem IV – 2022**, **Raluca-Marieta VISAN**, **Anca-Ruxandra LEONTIES***, **Ludmila ARICOV**, Daniel-George ANGELESCU

- 1/1 Raport științific

Toate rezultatele au fost diseminate online pe website-ul proiectului și pe pagina de social media :

<https://www.researchgate.net/profile/Leonties-Anca-Ruxandra/projects>

Rezumat executiv al Etapei 2

În cadrul obiectivul **O2.** s-au investigat proprietățile fizico-chimice ale microsferelor formate prin amestecarea chitosanului cu acid poliacrilic (Cs și PAA) precum și standardizarea metodei de imobilizare a lacazei. În urma documentării ample asupra posibilităților de a sintetiza suporturi de imobilizare polimerice a fost aleasă tehnica precipitarii polimerilor în baie de hidroxid și au fost sintetizate microsferelor polimerice (A2.1.O2.). Activitatea următoare (**A2.2.**) a condus la rezultate privitoare la compoziția chimică a suprafeței microsferelor. În urma desfășurării activităților (**A2.3.**) și (**A2.4.**) s-au obținut enzima imobilizată pe diferite suporturi solide și două protocoale de imobilizare optimizate. În cadrul activității (**A2.5.**) a fost realizată caracterizarea morfologiei CsPAALc din punct de vedere reologic. Pentru activitatea (**A2.6.**) a fost realizată evaluarea eficienței de degradare a ABTS de către enzima imobilizată și a fost făcută compararea cu enzima liberă. Tot în cadrul acestei activități a fost investigată și stabilitatea operațională a enzimei imobilizate pe 13 tipuri de suporturi solide.

Activățile etapei:

O2. A2.1. Documentare și sintetizarea microsferelor polimerice.

O2. A2.2. Caracterizarea microsferelor.

O2. A2.3. Imobilizarea enzimatică.

O2. A2.4. Testarea activității lacazei și optimizarea protocolului de imobilizare.

O2. A2.5. Caracterizarea morfologiei CSPAAALC din punct de vedere al omogenității, porozității și rezistenței la deformare.

O2. A2.6. Evaluarea eficienței de degradare a substraturilor clasice de către enzima imobilizată, compararea cu enzima liberă și investigarea stabilității operaționale.

Indicatori de rezultat preconizați:

- ✓ Redactarea și trimiterea spre publicare a unui (1) articol.
- ✓ Participarea la 2 conferințe științifice
- ✓ Diseminare rezultatelor obținute pe web-siteul proiectului.
- ✓ Redactarea și trimiterea raportului final.

Sumar al progresului

In cadrul etapei numărul 2 a proiectului IMLAC **s-au realizat integral indicatori de rezultat preconizați în cererea de finanțare**, și anume:

-2 / 1 Lucrări ISI trimise spre publicate/publicare:

1. Articol publicat: Trametes versicolor laccase activity modulated by the interaction with gold nanoparticles, **Ludmila Aricov, Aurica Precupas**, Madalina Tudose, Dragos Baltag, Bogdan Trică, Romica Sandu, **Anca Ruxandra Leonties***, Environmental Research, 237, 116920, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116920>. (IF 8.431)

2. Capitol publicat: Electron Transfer: Mechanisms in Oxidoreductase Enzymes, **Anca R Leonties, Ludmila Aricov**, Adina Raducan, Ed. IGI Global, Fundamental and Biomedical Aspects of Redox Processes, ISBN13: 9781668471982, 344-368DOI: 10.4018/978-1-6684-7198-2.ch016.

- 6 / 2 Prezentări conferințe internaționale:

1. Trametes Versicolor laccase activity modulated by gold nanoparticles, **Anca Ruxandra Leonties**, **Aurica Precupas**, Madalina Tudose, Dragos Baltag, Romica Sandu and **Ludmila Aricov**, **International Conference on Environmental Engineering and Management (ICEEM 12)**, Iasi, Romania (poster).
2. The poloxamers' aggregation behaviour in water and the influence of an anionic nonsulfated glycosaminoglycan on the micelle formation, **Alexandru Vincentiu Florian Neculae**, **Aurica Precupaș**, Vlad Tudor Popa, Iulia Matei, Sorin Mocanu, **Ludmila Aricov** și Gabriela Ioniță, **International Conference of Physical Chemistry ROMPHYSCHEM 17th**, Bucuresti, Romania, (prezentare orală).
3. Insights into the Interaction of Gold Nanoparticles with Trametes versicolor Laccase, **Aurica Precupaș**, **Ludmila Aricov**, Romică Sandu, Mădălina Tudose și **Anca Ruxandra Leontieș**, **International Conference of Physical Chemistry ROMPHYSCHEM 17**, Bucuresti, Romania, (poster).
4. Versatile Multilayered Hydrophobic and Antibacterial Coatings, **I. C. Gîfu**, R. Ianchiș, C. L. Nistor, M. Anastasescu, **A. R. Leontieș**, **L. Aricov**, M. E. Maxim și C. Petcu, **International Conference of Physical Chemistry ROMPHYSCHEM 17**, Bucuresti, Romania, (poster).

5. Laccase immobilized onto CS-PAA microspheres applied for synthetic dyes decomposition, **Anca Ruxandra Leonties, Ludmila Aricov, Raluca Marieta Vișan, Aurica Precupaș, Alexandru Vincențiu Florian Neculae, Ioana Catălina Gîfu, Adina Răducan, International Conference of Physical Chemistry ROMPHYSCHEM 17**, Bucuresti, Romania, (poster).

6. Modulating the Trametes versicolor Laccase activity with gold nanoparticles, **Anca Ruxandra Leonties, Ludmila Aricov, Aurica Precupas, Madalina Tudose, Dragos Baltag, Romica Sandu, 25 Materials, Methods & Technologies**, Burgas, Bulgaria (poster).

- 1/1 Raport științific

Toate rezultatele au fost diseminate:

Web site: https://www.icf.ro/pr_2022/IMLAC.pdf

Rezumat executiv al Etapei 3 /Ianuarie 2024 – aprilie 2024 /(4 luni)

Experimentele desfășurate în cadrul Obiectivul **O3**. au avut ca scop demonstrarea proprietăților catalitice ale microsferelor formate prin amestecarea chitosanului cu acid poliacrilic (Cs și PAA) pe care a fost imobilizată Lc, CSPAA Lc. În cadrul activității **A3.1**. s-au desfășurat experimente pentru a discerne între fenomenul de absorbție și cel de degradare enzimatică și a stabili existența efectelor sinergice. Desfășurarea activității **A3.2**. a condus la evaluarea factorilor ce afectează degradarea coloranților textili în prezența enzimei imobilizate folosind modele cinetice. În cadrul activității **A3.3**. s-au desfășurat experimente în vederea identificării produșilor de reacție precum și pentru evaluarea și validarea mecanismului de reacție propus.

Activitățile etapei:

O3. A3.1. Discernerea între absorbție, degradare enzimatică sau efecte sinergice.

O3.A3.2. Evaluarea factorilor ce afectează degradarea coloranților textili în prezența enzimei imobilizate folosind modele cinetice.

O3. A3.3. Identificarea produșilor de reacție, evaluarea și validarea mecanismului de reacție propus.

Indicatori de rezultat preconizați:

- ✓ Redactarea și trimiterea spre publicare a unui articol.
- ✓ Diseminare rezultatelor obținute pe web-siteul proiectului.
- ✓ Redactarea și trimiterea raportului final.

Sumar al progresului

In cadrul etapei numărul 3 a proiectului IMLAC s-au realizat integral indicatori de rezultat preconizați în cererea de finanțare, și anume:

-1 / 1 Lucrări ISI trimise spre publicare

1. Articol trimis spre publicare,

Effective degradation of azo dyes by ABTS-mediated laccase. A kinetic study, Emanuel Vacalie, Daniel Preda, Petruta Oancea, Anca Ruxandra Leonties, Ludmila Aricov, Adina Raducan, Under Review la Process Biochemistry, 22 feb 2024, (IF = 4.4), Q2.

- 1/1 Raport științific

Toate rezultatele au fost diseminate pe web-site: https://www.icf.ro/pr_2022/IMLAC.pdf

Rezumat executiv al obiectivelor realizate în perioada de implementare a proiectului
„Imobilizarea lacazei pe microsfele din CS-PAA și aplicarea acesteia pentru biodegradarea coloranților textili”

Durata proiect: 02.05.2022 - 01.05.2024

O problemă ecologică semnificativă este cea a poluării apelor de suprafață cu coloranți textili. Numeroase studii arată că atât distribuția în mediu, cât și biodisponibilitatea coloranților textili afectează oamenii și fauna acvatică de-o potrivă. Deși enzimele pot biodegrada cu succes contaminanții recalcitranți din apă, instabilitatea și costul mare de producție sunt un impediment pentru folosirea lor la scară industrială extinsă. Obiectivul principal al proiectului IMLAC a fost acela de a forma o echipă de cercetare tânără și independentă capabilă să inoveze în domeniul imobilizării enzimelor pe suporturi polimerice cu aplicații în descompunerea coloranților recalcitranți din medii apoase. În consecință, scopul tinerei echipe a proiectului IMLAC a fost acela de a dezvolta un protocol care să utilizeze o enzima imobilizată din clasa polifenol oxidazelor cu scopul a elimina indigo carmin, naftol verde și roșu de metil din medii apoase. Proiectul IMLAC a avut atât activități de cercetare de frontieră, obiective științifice fundamentale dar și aplicate. Obiectivul științific al echipei IMLAC de la Institutul de Chimie Fizică „Ilie Murgulescu” a avut un program de lucru format din trei axe complementare

1. Investigarea parametrilor operaționali ce pot afecta lacaza
2. Dezvoltarea de suporturi polimerice noi pentru imobilizarea lacazei, crearea și optimizarea unei metode inovatoare de imobilizare enzimatică.
3. Folosirea noilor produse cu lacază imobilizată pentru îndepărtarea coloranților textili din mediul apos.

✓ În cadrul proiectului au fost dezvoltate treisprezece tipuri de suporturi polimerice mixte. Pentru aceste suporturi au fost dezvoltate două protocoale de imobilizare a lacazei. Activitatea lacazei imobilizate a fost comparată cu cea a lacazei libere în cadrul studiilor de degradare a substraturilor clasice sau a coloranților textili selectați. Cercetarea integrată cu privire la stabilitatea operațională a examinat și calibrat producerea și utilizarea enzimelor imobilizate în funcție de temperatură, pH și modulatori (nanoparticule sau săruri). Studiile de reciclare ale catalizatorului indică faptul că este posibilă reducerea costurilor. O problemă întâlnită atunci când se utilizează lacază pentru tratarea apei ar putea fi formarea de produși toxici sau nebiodegradabili. Mecanisme de degradare identificate, arată că substraturile investigate sunt transformate în produși secundari ce ar fi susceptibili la degradarea bacteriană și fotocatalitică.

Indicatorii de rezultat propuși au fost: diseminarea rezultatelor prin corelarea globală a datelor experimentale, trimiterea spre publicare trei (3) articole și participarea la trei (3) conferințe științifice în timp ce mediatizarea va fi asigurată de construirea unui web-site.

- ✓ Indicatorii de rezultat realizați sunt: două articole publicate (Q1 și Q2), un articol trimis spre publicare (Q2), un capitol de carte într-o publicație indexată SCOPUS, 10 participări la conferințe naționale/internaționale și construirea web-site. De asemenea, echipa are în lucru un nou manuscris ce va fi trimis spre publicare în cursul acestui an.
- ✓ În cadrul acestui proiect au participat doi studenți doctoranzi (Alexandru Vicențiu Florian Necula și Raluca Marieta Toma). Ambii au făcut parte din colectivul publicare al articolelor și au participat la conferințe naționale și internaționale în cadrul acestui proiect. Aceste aspecte au contribuit la formarea lor ca cercetători în domeniul imobilizării enzimatică, îmbunătățindu-le astfel cunoștințele și extinzându-le domeniul de activitate.
- ✓ Rezultatele deja publicate în jurnale de top și prezentate la conferințe naționale și internaționale au condus și vor conduce la creșterea vizibilității științifice cercetătorilor din proiectul IMLAC. Spre exemplu, datorită temei studiate directorului de proiect i s-a mărit indicele H (de la 7 în 2022 la 12 în 2024). Pe de altă parte, îndeplinirea tuturor obiectivelor propuse în cele 24 de luni dovedește competența grupului în domeniul imobilizării enzimatică și conduce la noi colaborări între membrii echipei și alte grupuri de cercetare din România și nu numai.
- ✓ După cum se vede în publicații echipa proiectului IMLAC a colaborat cu alte departamente din institut și a dezvoltat legături cu cercetători și doctoranzi, interesați de cataliza enzimatică, din alte instituții prestigioase din România (ICECHIM, Universitatea din București- Facultatea de Chimie, Universitatea Politehnică - departmentul “Costin Nenițescu”).
- ✓ **Au fost identificate soluții științifice care ar putea susține dezvoltarea socială prin reducerea toxicității apei contaminate cu substanțe hazardoase sau persistente.** Metoda de imobilizare “verde”, proprie grupului **IMPLAC**, suportul de imobilizare constituit din materiale biodegradabile împreună cu biocatalizatorul (lacaza), oferă produselor finale atribute excelente pentru a fi aplicate, pe viitor în tratarea apelor poluate. Astfel, cunoștințele obținute în cadrul acestui proiect vor fi folosite pentru a extinde și mai mult aplicația lacazei imobilizate către transferul cunoștințelor în practica economică prin depunerea de noi proiecte în parteneriat cu operatori economici.